

Untersuchungen über die
Caeruloplasminaktivität im Serum bei
Kindern unter besonderer
Berücksichtigung der Mucoviscidose

von

Helmut Feuser

aus
Bonn

Aus der Kinderklinik der Universität
Erlangen - Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. A. Windorfer

Untersuchungen über die Caeruloplasminaktivität im Serum bei Kindern unter besonderer Berücksichtigung der Mucoviscidose

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von

Helmut Feuser

aus
Bonn

Gedruckt mit Erlaubnis der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. A. Kröncke

Referent: Priv.Doiz.Dr. F. Sitzmann

Coreferent: Prof.Dr.A. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.Juni 1969

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	3
Ergebnisse	7
Ergebnisse bei verschiedenen Erkrankungen im Kindesalter	12
Diskussion	14
Zusammenfassung	19
Literaturverzeichnis	21



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546303_0061

Untersuchungen über die Caeruloplasminaktivität im
Serum bei Kindern unter besonderer Berücksichtigung
der Mucoviscidose.

Das Caeruloplasmin wurde erstmals im Jahre 1948 von Holmberg und Laurell isoliert. (8) Es handelt sich um ein Serumprotein, das elektrophoretisch zu den α_2 -Globulinen gehört und ein Molekulargewicht von rund 151000 aufweist. Das Proteinmolekül enthält 8 Kupferatome, so daß sein Kupfergehalt 0,32% beträgt. (6,7,9,11,17,20,28,30,31) Im isolierten Zustand, was Holmberg und Laurell zunächst mit einer Präparation aus Schweineserum zeigen konnten, hat dieses Protein eine blaue Farbe, was zur Namensgebung Caeruloplasmin geführt hat. (8)

Marcowitz und Mitarbeiter erbrachten den Nachweis, daß Caeruloplasmin mit einer 50%-igen Ammoniumsulfatlösung aus dem Serum Gesunder ausgefällt werden kann (15). Die Autoren konnten so nachweisen, daß 90-96% des gesamten Plasmakupfers an Caeruloplasmin, der Rest des Plasmakupfers lose an Serumalbumine gebunden ist, und direkt mit Diäthyl-dithiocarbamat reagiert. Sie nannten dieses Serumkupfer daher direktes Kupfer und gaben seinen Normalwert mit $5 \pm 6 \mu\text{g}\%$ an. Dieses direkt reagierende Serumkupfer dient dem Kupfertransport in der Strombahn (15,17).

Das Caeruloplasmin ist ein Enzym und gehört in die Gruppe der Phenoloxidasen (4,6,7,9,11,15,17,19,20,21,22,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33). Seine physiologische Rolle ist heute noch nicht völlig geklärt. Das Enzym oxydiert das p-Phenylendiamin, die Polyphenole und die Polyamine, das Benzidin, Noradrenalin, Dihydroxyphenylalanin und die Ascorbinsäure (4,6,7,9,11,15,17,19,20,21,22,24,25,26,28,30,31). Richterich und Mitarbeiter haben darauf hingewiesen, daß das Caeruloplasmin kein einheitliches Enzym darstellt. Säulenchromatographisch (Hydroxylapatit) haben sie es in zwei Teile zerlegt:

in das C-C mit seinem größeren Molekulargewicht von 148000, welches pro Eiweißmolekül 8 Atome Kupfer enthält und über einen Hexosegehalt von 7% verfügt. Den kleineren Anteil bezeichneten sie als C-D (Mol.-Gewicht 125000); es enthält pro Eiweißmolekül 6 Atome Kupfer und 3,2% Hexose. Letzteres soll als Proenzym zu werten sein, welches auf die Wirkung der in der Leber gebildeten Kinase in das Enzym Caeruloplasmin umgewandelt wird (24,25,31). Das Enzym selbst wird wahrscheinlich ebenfalls in der Leber gebildet, durch die Galle ausgeschieden und kann bei Abflußbehinderungen im Serum in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (5,6,28). Das Plasma enthält die größte Menge dieses Enzyms, der Gehalt in der Leber und in den Nieren ist nur gering. Das ZNS, die Milz, sowie die Erythrocyten sind frei davon (17). Gefunden wurde es außerdem in der Synovia, in der Ascitesflüssigkeit, sowie im Liquor cerebrospinalis (28).

Eine für das klinische Routinelaboratorium brauchbare einfache kolorimetrische Methode wurde 1956 von Ravin beschrieben (19). Sie beruht auf einer Messung der enzymatischen Oxydation von p-Phenylendiamin durch Caeruloplasmin. Henry und Mitarbeiter haben diese Methode weiter ausgebaut (7). 1964 ist die von Ravin beschriebene Methode von Colombo und Richterich neu bearbeitet worden (6).

Für das Kindesalter wurden zwar bislang vereinzelte Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms vorgenommen, jedoch mit unterschiedlichen Methoden und damit mit unterschiedlichen Ergebnissen, so daß wir unsere Untersuchungen mit folgender Fragestellung durchführten:

1. Weichen die Normalwerte bezogen auf das Alter der Kinder voneinander erheblich ab?
2. Kann durch die Bestimmung der Aktivität des Caeruloplasmins im Serum bei Erkrankungen im Kindesalter eine differentialdiagnostische Hilfe erwartet werden, und

3. interessierte vor allem die Frage, ob bei der Mucoviscidose Veränderungen der Aktivität festzustellen sind?

Material und Methode

A. Methode:

I. Prinzip:

Das Caeruloplasmin katalysiert die Oxydation des farblosen p-Phenylendiamins zu einem purpurnen bis violetten Farbstoff. Die entstandene Farbkonzentration wird photometrisch ermittelt. Die Ermittlung des Leerwertes erfolgt durch Hemmung des Enzyms mit Natriumazid.

II. Apparate:

Zur Feststellung der Farbkonzentration wurde ein Photometer (Eppendorf) mit einem Filter mit 546 m μ benützt.

III. Reagentien:

1. Acetat - Puffer; 0,43 M; pH 5,6
1,34 ml Eisessig pro analysi und 26,44g Natrium-Acetat $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; MG 136,09 (z.B. Fluka 71180) werden mit Aqua dest. auf 1000 ml gelöst. pH 5,6. Gefroren ist der Puffer unbeschränkt haltbar.
2. Substrat - Lösung; 7,88 mM
36 mg p-Phenylendiamin $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2$; MG 181,08 (z.B. Merck Nr. 7247) werden in 25 ml Acetat - Puffer gelöst. Der pH sollte 5,6 sein. Eventuell muß die Lösung durch einige Tropfen 0,1n NaOH korrigiert werden. Die Haltbarkeit der Substrat-Lösung ist sehr schlecht. Sie muß daher vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt werden.

3. Natrium - Azid Lösung; 460 mM

3,0 g Natrium - Azid NaN_3 ; MG 65,02 (z.B. Fluka 71290) werden mit Aqua dest. auf 100 ml gelöst.
Die Lösung ist gut haltbar.

IV. Vorgehen:

In der vorliegenden Arbeit haben wir auf die kinetische Methode der Extinktionszunahme pro Zeiteinheit verzichtet, und der Zweipunkt - Bestimmung den Vorrang gegeben.

	Analyse	Leerwert
Serum, ml	0,02	0,02
Natrium - Azid Lsg, ml	----	0,2
Substrat - Lösung, ml	1,0	1,0

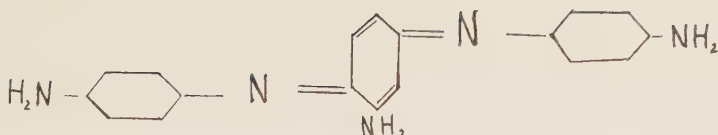
15 Minuten bei 37°C. inkubieren.

Natrium - Azid Lsg. ml	0,2	----
------------------------	-----	------

Nach weiteren 15 Minuten wird die Extinktion im Photometer (Eppendorf) bei Wellenlänge 546 m μ gegen Wasser abgelesen.

B. Eichung der Methode und Berechnung der Aktivität:

Normalerweise wird in der klinischen Chemie die Aktivität der Serumenzyme in Internationalen Einheiten (IU) angegeben. Rice schlägt nun ebenfalls zur Bestimmung des Caeruloplasmins diese Einheit vor (23). Dies setzt allerdings die Kenntnis des aus dem p-Phenylendiamin entstandenen Oxydationsproduktes voraus. Nur so ist die Berechnung eines molaren Extinktionskoeffizienten möglich. Rice nimmt als Oxydationsprodukt die Bandrowsky - Base $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_6$ an, und gibt folgende Strukturformel an:



Rice benützt den molaren Extinktionskoeffizienten dieser Verbindung zur Messung der Caeruloplasminaktivität in Internationalen Einheiten.

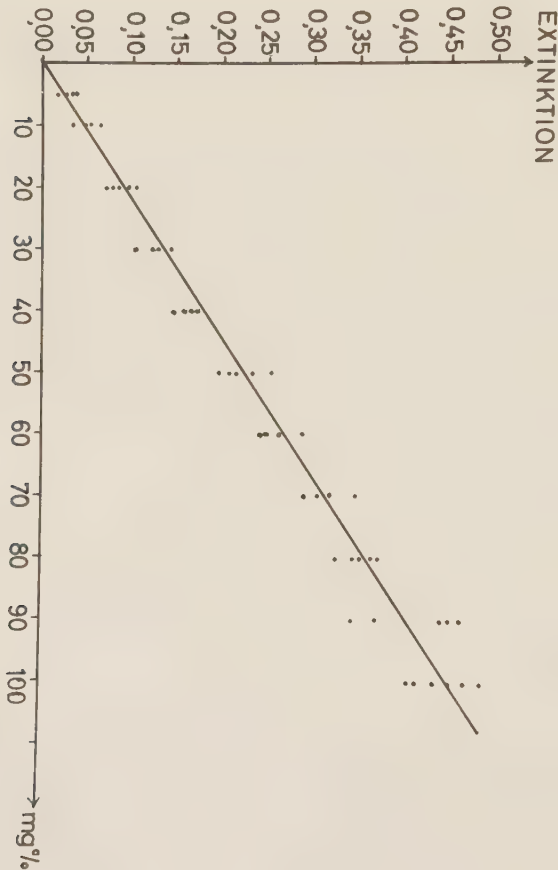
Nach Colombo und Richterich (6), sowie nach Peisach und Levine (13) kommt aber eine solche Verbindung höchstens als Zwischenprodukt bei der Oxydation des p-Phenylendiamins vor. Vielmehr erfolgt die Oxydation in zwei Schritten. Beim ersten werden aus dem aromatischen Diamin freie Radikale gebildet, beim zweiten Schritt entstehen höhere Oxydationsprodukte, die sich zu einem stabilen Endprodukt polymerisieren, dessen Zusammensetzung noch nicht genau geklärt ist.

Henry und Mitarbeiter benützen zur Eichung Pontacylviolett, einen Farbstoff, der ein ähnliches Absorptionsmaximum besitzt, wie das Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins (6,7). Diese Substanz ist jedoch ungeeignet, da sie nicht identisch ist mit dem Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins.

In der vorliegenden Arbeit wird das Caeruloplasmin in Gewichtseinheiten und zwar in mg/100 ml angegeben. Zur Eichung wurde reines Caeruloplasmin mit einem Reinheitsgrad von 70 - 80% benutzt, (z.B. Kabi-Chemie, Stockholm). Es wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, deren Werte im Bereich der physiologischen Serumkonzentrationen liegen.

Abb. 1

Eichkurve für das Caeruloplasmin in mg/100 ml und für die gemessene Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von $546\text{ m}\mu$. Die Eichkurve wurde mit einer Verdünnungsreihe von 70-80% reinem Caeruloplasmin ermittelt.



Die Enzymaktivität in mg/100 ml wird aus der gemessenen Extinktion durch Multiplikation mit dem experimentell ermittelten Faktor berechnet. Der Faktor beträgt bei der vorliegenden Methode, bei einer Wellenlänge von 546 m μ und mit Küvetten von 1 cm Schichtdicke 222. Daraus ergibt sich:

$$\text{mg Caeruloplasmin/100 ml} = (E_A - E_L) \times 222$$

E r g e b n i s s e

Es wurde die Aktivität des Caeruloplasmins bei stoffwechselgesunden Kindern in verschiedenen Altersgruppen untersucht und die Normalwerte ermittelt. Der Mittelwert wurde statistisch nach folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n x}{n}$$

wobei "x" den jeweils gemessenen Wert darstellt und "n" die Anzahl der Messungen.

Für die Streuung "G" gilt folgende Formel:

$$G = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\Delta x)^2}{n-1}}$$

Nach der Statistik liegen im Bereich $M \pm G$ 68% aller Meßwerte. Dies kann als ausreichend genau zur Bestimmung von Normalwerten angesehen werden.

Bei unseren Untersuchungen interessierte aber vor allem, ob die Mittelwerte von verschiedenen Altersgruppen signifikant verschieden sind. Es mußte daher der mittlere Fehler des Mittelwertes errechnet werden, um so die Meßreihen untereinander vergleichen zu können. Wir bedienten uns folgender Formel zur Bestimmung des mittleren Fehlers: " $\bar{G}$ " = $\frac{G}{\sqrt{n}}$

Im Bereich von $3\bar{G}$ liegen 99,7% aller Mittelwerte, die untereinander nicht signifikant verschieden sind. Zwei Meßreihen sind daher als signifikant verschieden zu betrachten, wenn:

$$M_1 - M_2 > 3 \sigma_1 \text{ oder } 3 \sigma_2$$

1. Altersgruppe:

15 Fälle von stoffwechselgesunden Kindern im Alter von 1 - 2 Jahren.

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	53,0 mg%	9,5	90,0
2	80,0 mg%	17,5	305,0
3	75,5 mg%	13,0	169,0
4	50,0 mg%	12,5	156,0
5	59,0 mg%	3,5	12,3
6	73,5 mg%	11,0	121,0
7	70,0 mg%	7,5	56,0
8	55,5 mg%	7,0	49,0
9	44,5 mg%	18,0	324,0
10	71,0 mg%	8,5	72,0
11	55,5 mg%	7,0	49,0
12	59,0 mg%	3,5	12,3
13	62,0 mg%	0,5	0,3
14	69,0 mg%	6,5	42,3
15	61,5 mg%	1,0	1,0

$$M = 62,5 \text{ mg\%} \quad \bar{G} = \pm 10,2 \quad 3\bar{G} = 7,8$$

Die Normalwerte für gesunde Kinder im Alter von 1-2 Jahren liegen in einem Bereich von 52,3 - 72,7 mg%.

2. Altersgruppe:

15 Fälle von stoffwechselgesunden Kindern im Alter von 3 - 4 Jahren:

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	69,0 mg%	5,5	30,0
2	76,5 mg%	13,0	169,0
3	79,0 mg%	15,5	240,0
4	62,5 mg%	1,0	1,0
5	49,0 mg%	14,5	210,0
6	51,0 mg%	12,5	156,0
7	53,5 mg%	10,0	100,0
8	48,0 mg%	15,5	240,0
9	62,0 mg%	1,5	2,3
10	66,5 mg%	3,0	9,0
11	70,0 mg%	6,5	42,3
12	49,0 mg%	14,5	210,0
13	78,0 mg%	14,5	210,0
14	76,5 mg%	13,0	169,0
15	62,5 mg%	1,0	1,0

$$M = 63,5 \text{ mg\%}$$

$$G = \pm 11,3$$

$$3\bar{G} = 8,7$$

Die Normalwerte für gesunde Kinder im Alter von 3 - 4 Jahren liegen also in einem Bereich von 52,3 - 74,8 mg%.

3. Altersgruppe:

13 Fälle von stoffwechselgesunden Kindern im Alter von 5 - 6 Jahren:

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	60,0 mg%	3,5	12,3
2	52,5 mg%	4,0	16,0
3	60,0 mg%	3,5	12,3
4	52,0 mg%	4,5	20,3

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
5	55,5 mg%	1,0	1,0
6	61,0 mg%	4,5	20,3
7	44,5 mg%	12,0	144,0
8	61,0 mg%	4,5	20,3
9	44,5 mg%	12,0	144,0
10	69,0 mg%	12,5	156,0
11	52,0 mg%	4,5	20,3
12	60,0 mg%	3,5	12,3
13	61,0 mg%	4,5	20,3

$$M = 56,5 \text{ mg\%}$$

$$\bar{G} = \pm 7$$

$$3\bar{G} = 5,85$$

Die Normalwerte für gesunde Kinder im Alter von 5 - 6 Jahren liegen in einem Bereich von 49,5 - 63,5 mg%.

4. Altersgruppe:

19 Fälle von stoffwechselgesunden Kindern im Alter von 7 - 14 Jahren:

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	49,0 mg%	8,0	64,0
2	53,0 mg%	4,0	16,0
3	51,0 mg%	6,0	36,0
4	52,0 mg%	5,0	25,0
5	44,5 mg%	12,5	156,3
6	75,5 mg%	18,5	342,5
7	64,5 mg%	7,5	56,3
8	65,5 mg%	8,5	72,3
9	61,0 mg%	4,0	16,0
10	51,0 mg%	6,0	36,0
11	44,5 mg%	12,5	156,3
12	57,5 mg%	0,5	0,3
13	70,0 mg%	13,0	169,0
14	49,0 mg%	8,0	64,0
15	65,5 mg%	8,5	72,3
16	46,5 mg%	10,5	110,3

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
17	55,5 mg%	1,5	2,3
18	57,5 mg%	0,5	0,3
19	71,0 mg%	14,0	196,0
$M = 57,0 \text{ mg\%}$		$G = \pm 9,4$	$3 \bar{G} = 6,5$

Die Normalwerte für gesunde Kinder im Alter von 7 - 14 Jahren liegen in einem Bereich von 47,6 - 66,4 mg%.

Aus den gefundenen Mittelwerten und den dazugehörigen mittleren Fehlern des Mittelwertes ergibt sich, daß keine der untersuchten Altersgruppen, beziehungsweise deren Mittelwerte voneinander signifikant verschieden sind. Es ist daher angebracht, die Normalwerte für die Serumkonzentration des Caeruloplasmins im Alter von 1 - 14 Jahren aus der Gesamtzahl der Fälle zu ermitteln, da somit der Mittelwert und die Streubreite der Meßwerte genauer bestimmt werden können.

In unseren bisherigen Untersuchungen haben wir für die Streubreite allein den Wert von $1 \bar{G}$ benutzt. Im Bereich von $1 \bar{G}$ liegen jedoch nur 68% aller möglichen Einzelwerte. Um aber die Streubreite bei der Bestimmung des Enzyms exakter bestimmen zu können, muß man den Wert von $3 \bar{G}$ benützen, da somit 99,7% aller Meßwerte erfaßt werden.

In unserem Fall ergab sich aus 62 Einzelmessungen ein Mittelwert von $M = 58,8 \text{ mg\%}$ und eine Streubreite von $G = \pm 28,35$. Somit liegen also die Normalwerte für gesunde Kinder von 1 - 14 Jahren in einem Bereich von 31,45 - 88,15 mg% Caeruloplasmin.

Ergebnisse bei verschiedenen Erkrankungen im Kindesalter:

1. Nephrose:

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	101,0 mg%	6,5	42,5
2	66,5 mg%	18,0	324,0
3	81,0 mg%	3,5	12,3
4	49,5 mg%	35,0	1230,0
$M = 84,5 \text{ mg\%}$		$\bar{G} = \pm 23,2$	$3 \bar{G} = 34,8$

2. Enteritis:

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	75,5 mg%	10,2	104,0
2	61,0 mg%	4,7	22,0
3	89,0 mg%	23,3	540,0
4	47,8 mg%	18,0	325,0
5	55,5 mg%	10,2	104,0
$M = 65,7 \text{ mg\%}$		$\bar{G} = \pm 16,5$	$3 \bar{G} = 21,9$

3. Hepatitis:

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	75,5 mg%	18,0	325,0
2	60,0 mg%	2,5	6,3
3	60,0 mg%	2,5	6,3
4	61,0 mg%	3,5	12,3
5	35,5 mg%	22,0	494,0
6	84,0 mg%	26,5	673,0
7	48,5 mg%	9,0	81,0
8	62,0 mg%	4,5	20,3

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
9	53,0 mg%	4,5	20,3
10	49,5 mg%	8,0	64,0
11	60,0 mg%	2,5	6,3
12	43,5 mg%	14,0	196,0
$M = 57,5 \text{ mg\%}$ $\bar{G} = \pm 13,2$ $3 \bar{G} = 11,7$			

4. Mucoviscidose:

Nr.	x	Δx	$(\Delta x)^2$
1	64,4 mg%	7,2	52,0
2	44,4 mg%	12,8	164,0
3	74,5 mg%	17,3	300,0
4	37,6 mg%	19,6	385,0
5	58,0 mg%	0,8	0,6
6	64,5 mg%	7,3	53,5
7	35,5 mg%	21,7	445,0
8	74,4 mg%	17,2	295,0
9	52,5 mg%	4,7	22,0
10	42,4 mg%	14,8	219,0
11	68,0 mg%	10,8	116,0
12	60,0 mg%	2,8	7,8
13	56,6 mg%	0,6	0,4
14	61,0 mg%	3,8	14,4
15	77,7 mg%	20,5	420,0
16	44,0 mg%	13,2	174,0
17	70,0 mg%	12,8	164,0
18	71,0 mg%	13,8	190,0
19	32,2 mg%	25,0	625,0
$M = 57,2 \text{ mg\%}$ $\bar{G} = \pm 4,5$ $3 \bar{G} = 1$			

D i s k u s s i o n

Es gibt zahlreiche Methoden, die Aktivität des Caeruloplasmins im Serum zu bestimmen, jedoch hat sich als die zuverlässigste Methode die Bestimmung der enzymatischen Aktivität herausgestellt. Bereits Holmberg und Laurell konnten 1951 den Enzymcharakter des Caeruloplasmins nachweisen und somit den Weg für weitere Untersuchungen öffnen (9).

Das Caeruloplasmin gehört zu den Phenoloxydasen und katalysiert oxydative Vorgänge. Die Konzentration einer Oxydase wird dadurch bestimmt, daß man die Geschwindigkeit, mit der ein oxydativer Vorgang abläuft, mißt. Dies setzt allerdings voraus, daß das entstandene Oxydationsprodukt irreversibel und seine chemische Struktur bekannt ist. Wir haben in unserem Fall das p-Phenylendiamin benutzt, das bei der Oxydation in einen violetten Farbstoff umgewandelt wird. Welche chemische Struktur dieser Farbstoff hat, ist noch unbekannt. Man kann auch andere Phenole benutzen, so hat Bickel zum Beispiel das Gujakol verwendet. (1) Die Substratspezifität des Caeruloplasmins ist jedoch gegenüber p-Phenylendiamin am größten (9). Rice vermutet in seinen Arbeiten, daß es sich bei dem Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins um die Bandrowski - Base handelt (23). Peisach und Levine, sowie Colombo und Richterich glauben jedoch, daß eine solche Base höchstens als Zwischenprodukt in Frage kommt (6,13). Solange das Endprodukt, welches bei der katalytischen Oxydation des p-Phenylendiamins entsteht, nicht bekannt ist, kann man das Enzym nicht in Internationalen Einheiten (IU) angeben, denn Internationale Einheiten sind als μM umgesetztes Substrat/min/1000 ml definiert. Kleinbaum hat das Caeruloplasmin in Aktivitätseinheiten (AE) angegeben, wobei er eine AE als den Anstieg der Absorption um 0,001 innerhalb von 30 Minuten definiert (11). Andere Autoren benutzen die Extinktion nach einer bestimmten Zeiteinheit und multiplizieren diesen Wert mit 1000 und erhalten so

den zahlenmäßigen Wert der Enzymaktivität (7,17,30).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Caeruloplasmin in Gewichtseinheiten gemessen und zwar in mg/100 ml. Zur Bestimmung der Quantität der umgesetzten Menge von p-Phenylen-diamin wurde die entstandene Farbtintensität benutzt, die ein Absorptionsmaximum bei 530 m μ hat und so gegen ein entsprechendes Filter photometrisch bestimmt werden kann (6,7,8,19). Dabei kann man entweder die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit oder die nach einer bestimmten Zeit entstandene Extinktion messen. Wir haben in der vorliegenden Arbeit der zweiten Methode den Vorrang gegeben.

Zur Bestimmung von Normalwerten ist jedoch in diesem Fall eine Bezugsgröße notwendig. Wir haben daher eine Eichkurve erstellt, die durch eine Verdünnungsreihe von 70 - 80 % reinem Caeruloplasmin experimentell ermittelt wurde. Man hat so eine genaue Relation zwischen absoluter Menge an Caeruloplasmin und der entsprechenden Extinktion am Photometer.

Nach der Fragestellung sollte untersucht werden, ob die Enzymaktivitäten beim Kind in verschiedenen Altersgruppen erheblich voneinander abweichen. Wir haben 62 Kinder im Alter zwischen 1 und 14 Jahren in vier Altersgruppen unterteilt. Dabei wurden folgende Normalwerte ermittelt. In der ersten Altersgruppe von Kindern zwischen 1 und 2 Jahren: 52,3 - 72,2 mg%. In der zweiten Altersgruppe von Kindern zwischen 3 und 4 Jahren: 52,3 - 74,8 mg%. In der dritten Altersgruppe von Kindern zwischen 5 und 6 Jahren: 49,5 - 63,5 mg%, und in der vierten Altersgruppe von Kindern zwischen 7 und 14 Jahren: 47,6 - 66,4 mg%. Diese gefundenen Werte zeigen auf, daß in den vorgenannten Altersgruppen die Mittelwerte für die Konzentration des Caeruloplasmins im Serum nicht signifikant voneinander abweichen. Cao und Mitarbeiter haben in ihren Arbeiten dargelegt, daß unter physiologischen Bedingungen in den ersten beiden

Lebensjahren eine Hypocaeruloplasminämie vorliegt (4). Für das zweite Lebensjahr konnte das von uns nicht bestätigt werden. Zahlreiche andere Autoren haben ebenfalls festgestellt, daß zwar im ersten Lebensjahr eine verminderte Caeruloplasminaktivität zu beobachten ist, daß jedoch nach dem zwölften Lebensmonat die Werte des Erwachsenen erreicht werden (11,17,30). Die Untersuchungen von Sternlieb und Scheinberg ergaben den Normalwert des Erwachsenenalters bereits im 3. - 6. Monat (28). Da die untersuchten Altersgruppen keine signifikante Abweichung untereinander aufweisen, haben wir alle gefundenen Meßwerte dazu benutzt, die Normalwerte für das Alter von 1 - 14 Jahren zu ermitteln. Es wurde ein Mittelwert von 59,8 mg% mit einer Streuung von $3\sigma = \pm 28,35$ errechnet. Die ermittelten Normalwerte für Caeruloplasmin im Serum liegen in einem Bereich von 31,45 - 88,15 mg%.

Die in der Literatur veröffentlichten Normalwerte divergieren stark. Es fällt auf, daß in älteren Veröffentlichungen die Normalwerte für das Caeruloplasmin niedriger angegeben werden, zum Beispiel Normalwerte zwischen 23 und 44 mg% im Handbuch der Kinderheilkunde von 1965. (3) Markowitz hat die Aktivität 1955 mit 34 mg% angegeben, was von Kleinbaum 1963 als gesichert angesehen wurde (11,15). Auch Sternlieb und Scheinberg (1961) ermittelten Normalwerte von 20 - 35 mg% (28). Erst neuere Arbeiten zeigten auf, daß der tatsächliche Caeruloplasminspiegel höher liegt und die Normalwerte erheblich streuen. Prellwitz gibt in seiner Arbeit von 1968 die Normalwerte mit 20 - 60 mg% an und Lorentz ermittelte ebenfalls 1968 Normalwerte zwischen 27 und 73,4 mg% (14,18). Somit stimmen die in unserer Klinik ermittelten Normalwerte durchaus mit denen der neueren Veröffentlichungen überein. Daß die gefundenen Werte von denen der älteren Veröffentlichungen abweichen, dürfte auf die verbesserte Technik zurückzuführen sein.

Ein weiteres Anliegen unserer Untersuchungen war es, festzustellen, ob die Aktivität des Caeruloplasmins differential-

diagnostisch auszuwerten sei. Zahlreich sind die Versuche, die Aktivität des Caeruloplasmins als Diagnostikum der Akuten - Phase Reaktion zu bestimmen (6,15,16,17,20,21, 22,28,31). Aber auch hier sind die einzelnen Autoren unterschiedlicher Auffassung. Rice hat bei seinen Untersuchungen festgestellt, daß bei entzündlichen Prozessen die Caeruloplasminaktivität erhöht sein kann (20,21,22). Turey kommt in seiner vergleichenden Arbeit zu dem Ergebnis, daß die Steigerung der Enzymaktivität ein empfindlicherer Indikator für den Prozess sei als die beschleunigte Blutsenkung und der erhöhte Glykoproteingehalt (31). Müller und Mitarbeiter hingegen stellten bei Untersuchungen über die Aktivitätsdiagnostik entzündlicher Erkrankungen fest, daß das Caeruloplasmin zum Nachweis eines entzündlichen Prozesses wenig geeignet ist, da dieses Globulin oft noch im Normbereich liegt, wenn alle anderen Reaktionen positive Resultate ergeben (16).

Da in der Diagnostik von Lebererkrankungen die Bestimmung der Enzymaktivitäten eine große Rolle spielt, haben sich viele Autoren mit der Bestimmung der Caeruloplasminaktivität bei Erkrankungen der Leber beschäftigt. Aber auch hier weichen die Ergebnisse stark voneinander ab. Übereinstimmend ist jedoch, daß bei Abflußbehinderungen der Galle die Serumkonzentration signifikant ansteigt. (6,10,14,18) Ebenso gilt als gesichert, daß bei chronischen Lebererkrankungen, insbesondere bei solchen, die mit einem cirrhotischen Umbau einhergehen, infolge der mangelnden Synthese der Caeruloplasminspiegel erniedrigt ist. (10,14,17,18,27,28,29). Bei der Frage, ob die Enzymaktivität bei der Hepatitis epidemica signifikant verändert ist und ob sich diese Veränderung diagnostisch verwerten läßt, divergieren die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen. Scano und Mitarbeiter beobachteten während der akuten Phase der Hepatitis keine Veränderung in der Caeruloplasminaktivität, jedoch liege in der klinischen und humoralen Regressionsphase eine Tendenz zu niederen Werten vor. (26) Scheiffarth und Mitarbeiter fanden, daß der Mittelwert bei Hepatitiden signifikant höher liegt (27).

Auch Lorentz und Gassdorfer stellten in ihren Untersuchungen fest, daß bei der akuten Hepatitis im Frühstadium die Enzymwerte im Serum erhöht sind (14). Keller und Mitarbeiter hingegen glauben, daß die von manchen Autoren angegebene erhöhte Caeruloplasminaktivität im Serum bei der Hepatitis epidemica vermutlich mit dem verminderten Galleabfluß während des ikterischen Frühstadiums dieser Krankheit in Verbindung zu bringen ist (10). Bei unseren Untersuchungen von 12 Fällen mit gesicherter Hepatitis wurde ein Mittelwert von 57,5 mg% mit einer Streuung von $\sigma = \pm 13,2$ gefunden. Dieser Wert weicht nicht signifikant von dem Mittelwert gesunder Kinder ab, so daß die Bestimmung des Caeruloplasmins zur Differentialdiagnose bei der Hepatitis epidemica uns ungeeignet erscheint.

Da es sich bei dem Enzym Caeruloplasmin um ein Protein handelt, kann erwartet werden, daß bei allen Erkrankungen, die mit einem Eiweißverlust oder mit einer mangelnden Eiweißresorption einhergehen, die Serumkonzentrationen erniedrigt sind. Insbesondere gilt das für das nephrotische Syndrom, bei dem durch renalen und enteralen Eiweißverlust niedrige Werte zu erwarten sind (2,12,28,30). Bei den von uns untersuchten 4 Fällen lagen die Werte im oberen Bereich der Norm. Worauf diese Diskrepanz zurückzuführen ist, war nicht zu klären.

Bei der Mucoviscidose kann man zwischen zwei klinischen Erscheinungsbildern unterscheiden. Einmal die enterale Form, die in der angelsächsischen Literatur auch als "Cystische Pankreasfibrose" bezeichnet wird, und der pulmonalen Form. Diese beiden Manifestationen können jedoch nicht streng voneinander getrennt werden, da sie nur angeben, welches klinische Bild im Vordergrund steht. Wir haben daher bei unseren Untersuchungen die Mucoviscidose als Gesamterkrankung aufgefaßt, gleichgültig, welches klinische Bild leitend war. Bei der Mucoviscidose handelt es sich um eine pathologische Veränderung des Sekrets der exkretorischen Drüsen. Bei der enteralen Form ist daher hauptsächlich

das Pankreas betroffen. Durch einen Enzymmangel ist daher die Eiweißresorption und somit auch die Synthese körpereigener Proteine gestört. Daher liegt die Vermutung nahe, daß das Caeruloplasmin als ein in der Leber synthetisiertes Protein nur in geringen Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden kann. Wir haben 19 Fälle von Mucoviscidose untersucht und einen Mittelwert von 57,2 mg% festgestellt. Die Diagnose der Mucoviscidose erfolgte durch die Pilocarpin - Jontophorese, welche in allen Fällen pathologische Werte aufwies. Der gefundene Mittelwert bei unseren Mucoviscidosepatienten weicht aber, entgegen der Erwartung, nicht signifikant von dem gesunder Kinder ab. Dies dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß der bei der Mucoviscidose typische Pankreasfermentmangel iatrogen substituiert wurde und somit eine ausreichende Eiweißresorption möglich war. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß die Bestimmung der Caeruloplasminaktivität im Serum bei der Mucoviscidose keine diagnostischen Hinweise gibt.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde eine verbesserte Methode zur enzymatischen Bestimmung der Caeruloplasminaktivität im Serum beschrieben. Das Caeruloplasmin wurde in Gewichtseinheiten angegeben (mg/100 ml), weil die Angabe in Internationalen Einheiten (IU) noch nicht möglich ist, da man das entstandene Oxydationsprodukt des p-Phenylendiamins noch nicht genau kennt.

62 stoffwechselgesunde Kinder wurden in 4 Altersgruppen unterteilt und die jeweiligen Normalwerte für das Caeruloplasmin ermittelt, wobei keine signifikanten Abweichungen innerhalb der einzelnen Altersgruppen festgestellt werden konnten. Der Mittelwert aller 62 Einzelmessungen lag bei 58,8 mg% mit einer Streubreite von $3\sigma = \pm 28,35$.

Besonderes Interesse kam dem Verhalten des Caeruloplasmins bei verschiedenen Erkrankungen im Kindesalter zu. Insbesondere wurde die Enzymaktivität bei der Hepatitis und der Mucoviscidose untersucht. Sowohl bei der Hepatitis als auch bei der Mucoviscidose kann die Bestimmung des Caeruloplasmins nicht zur Differentialdiagnose herangezogen werden, da sämtliche ermittelten Werte im physiologischen Streubereich liegen, der sehr groß ist.

Literaturverzeichnis

- 1.) Bickel, H.; H.E. Schultze, W. Grüter, J. Göllner
Versuche zur Caeruloplasminsubstitution bei der
hepatocerebralen Degeneration.
Klin. Wschr. 34, 961-968, (1956)
- 2.) Bickel, H.
Die Wilsonsche Krankheit als Stoffwechselproblem.
Dtsch. med. Wschr. 83, 766-769, (1958)
- 3.) Bickel, H.
Die Wilsonsche Krankheit
Handbuch der Kinderheilkunde 4. Band 1965
Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New-York
- 4.) Cao, A.; V. Scano e M. Silvetti
Comportamento della ceruloplasmina in condizioni
fisiologiche.
Ann. ital. Pediat. 13, 726-738, (1960)
- 5.) Cartwright, G.E.; H. Markowitz, G.S. Shields and
M.M. Wintrobe
Studies on Copper Metabolism XXIX.
A Critical Analysis of Serum Copper and Ceruloplasmin
Concentrations in Normal Subjects, Patients with
Wilson's Disease and Relatives of Patients with
Wilson's Disease.
Amer. J. Med. 28, 555-563, (1960)
- 6.) Colombo, J.P.; R. Richterich
Zur Bestimmung des Caeruloplasmins im Plasma.
Schw. med. Wschr. 94, 715-720, (1964)
- 7.) Henry, J.; N. Chiamori, S.L. Jacobs, M. Segalove
Determination of Ceruloplasmin Oxydase in Serum.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 104, 620-624, (1960)

- 8.) Holmberg, C.G. and C.B. Laurell
Investigations in Serum Copper.
II. Isolation of the Copper Containing Protein, and
a Description of some of its Properties.
Acta chem.scand. 2, 550-556, (1948)
- 9.) Holmberg, C.G. and C.B. Laurell
Investigations in Serum Copper.
III. Coeruloplasmin as an Enzyme.
Acta chem.scand. 5, 476-480, (1951)
- 10.) Keller-Bacoka, M.; L. Kallai
Die p-Phenylendiamin (PPD) - Oxydaseaktivität im Serum
bei Leberkrankheiten.
Z.ges.exp.Med. 135, 361-367, (1962)
- 11.) Kleinbaum, H.
Über die Coeruloplasminaktivität im Serum bei gesunden
Kindern verschiedener Altersklassen.
Z.Kinderheilk. 88, 11-21, (1963)
- 12.) Kluthe, R.; H.H. Liem, D. Nusslé, S. Barandun
Enteraler Plasmaeiweißverlust beim nephrotischen
Syndrom.
Klin.Wschr. 41, 15-18, (1963)
- 13.) Levine, W.G.; J. Peisach
Ethylenediaminetetraacetate Iron and Ceruloplasmin
Aktivity.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 77, 602-614, (1963)
- 14.) Lorentz, K.; K. Gassdorfer
Der diagnostische Wert der Coeruloplasminbestimmung
in der Enzymdiagnostik von Leberkrankheiten.
Z.Gastroent. 6, 414-417, (1968)

- 15.) Markowitz, H.; C.J. Gubler, J.P. Mahoney, G.E. Cartwright and M.M. Wintrobe
Studies on Copper Metabolism.
XIV. Copper, Ceruloplasmin and oxydase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infections, hepato-lenticular degeneration and the nephrotic syndrome.
J.clin.Invest. 34, 1498-1508, (1955)
- 16.) Müller, W.; R. Kluthe und H. Müller
Zur Aktivitätsdiagnostik chronisch rheumatischer Erkrankungen, unter besonderer Berücksichtigung der quantitativen Bestimmung von Haptaglobin und Coeruloplasmin.
Z. Rheumaforsch. 22, 1-10, (1963)
- 17.) Pojerová, A.; J. Továrek
Ceruloplasmin in early childhood.
Acta paediat. (Uppsala) 49, 113-120, (1960)
- 18.) Prellwitz, W.; C.H. Hammar, J. Dudek
Haptaglobin und Coeruloplasmin bei Krankheiten der Leber und der Gallenwege.
Dtsch.med.Wschr. 93, 1277-1281, (1968)
- 19.) Ravin, H.A.; M.D. Harvard
Rapid Test for Hepatolenticular Degeneration.
Lancet 1956/I, 726-727
- 20.) Rice, E.W.
Correlation between Serum Copper Ceruloplasmin activity and C-reactive Protein.
Clin.chim.Acta 5, 632-636, (1960)
- 21.) Rice, E.W.
A Study on Correlations between C-reactive Protein and certain other Acute-Phase Reactions.
Clin.chim.Acta 6, 170-173, (1961)

- 22.) Rice, E.W.
Evaluation of the Role of Ceruloplasmin as an
Acute-Phase Reactant.
Clin.chim.Acta 6, 652-655, (1961)
- 23.) Rice, E.W.
zitiert nach J.P.Colombo und R.Richterich
Zur Bestimmung des Caeruloplasmins im Plasma.
Schw.med.Wschr. 94, 715-720, (1964)
- 24.) Richterich, R.
Neuere Untersuchungen über das Caeruloplasmin.
Jahrb.Kinderheilk. 196, 274-275, (1961)
- 25.) Richterich, R.; A.Temperli, und H.Aebi
Die Heterogenität des Caeruloplasmins:
Isolierung und Charakterisierung von zwei Cupro-
Proteinen aus Human-Serum.
Biochim.biophys.Acta (Amst) 56, 240-251, (1962)
- 26.) Scano, V.; A.Cao, M.Silvetti
Sul valore della ceruloplasmina serica nella fisiologica
e patologica infantile.
Ann.ital.Pediat. 13, 816-826, (1960)
- 27.) Scheiffarth, F.; H.Götz, F.Czagany
Zur quantitativen Bestimmung der Caeruloplasmin-
konzentration im Serum unter besonderer Berücksichti-
gung von Leberparenchymerkrankungen und malignen
Prozessen.
Med.Welt 28, 1449-1453, (1961)
- 28.) Sternlieb, I.; I.H.Scheinberg
Ceruloplasmin in Health and Disease.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 94, 71-76, (1961)

- 29.) Stillhart, H.; R. Richterich, E. Rossi
Die monosymptomatisch hepatische Form der hepatolenticulären Degeneration.
Schw.med.Wschr. 91, 1272-1277, (1961)
- 30.) Turey, P.; J. Kiss, J. Szorady, M. Bermatsky
Untersuchungen über die Caeruloplasminaktivität im Säuglings- und Kindesalter.
Mschr.Kinderheilk. 111, 403-409, (1963)
- 31.) Turey, P.; J. Szorady, J. Kiss
Über die Bewertbarkeit der Caeruloplasminaktivitätsbestimmung vom Gesichtspunkt der Akute-Phase Reaktion.
Mschr.Kinderheilk. 113, 366, (1965)
- 32.) Weber, H. und T. Wegemann
Atlas der klinischen Enzymologie.
Georg Thieme Verlag "Stuttgart"
- 33.) Zipursky, A.; H. Dempsey, H. Markowitz, G. Cartwright
M.M. Wintrobe
Studies on Copper Metabolism.
Amer.J.Dis.Child. 96, 148-158, (1958)

An dieser Stelle danke ich Herrn Priv.Doiz.Dr.med.
F.Sitzmann für die Überlassung des Themas, sowie für
die freundliche Übernahme des Referates und für die
zahlreichen Anregungen und Hinweise zur Bearbeitung
der Fragestellung und Ausgestaltung der Dissertation.

Danken möchte ich auch Herrn Prof.Dr.med. A.Windorfer
für die bereitwillige Übernahme des Coreferates.

Lebenslauf

Am 13. November 1939 wurde ich als Sohn der Eheleute Amtsgerichtsrat Walter Feuser und Frau Margot geb. Laubach in Bonn geboren. Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Saarbrücken. Von 1950 bis 1953 war ich Schüler der Oberrealschule zu Saarbrücken. 1953 wechselte ich nach Ettenheim/Baden, wo ich bis 1958 das "Städtische Gymnasium" besuchte. Von 1958 bis 1959 besuchte ich das "Max-Planck-Gymnasium" in Lahr/Baden, wo ich Ostern 1959 meine Reifeprüfung ablegte. Vom 5. Oktober 1959 bis zum 30. Oktober 1960 leistete ich meinen Wehrdienst ab. Im Sommersemester 1961 begann ich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz das Studium der Medizin. Dort legte ich im April 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung mit dem Urteil "gut" ab. Im Sommersemester 1964 wechselte ich zur Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, wo ich im November 1965 meine ärztliche Vorprüfung mit dem Urteil "gut" bestand. Darauf folgte ein sechs semestriges klinisches Studium. Im Januar 1969 bestand ich an der gleichen Universität die ärztliche Prüfung mit dem Urteil "sehr gut".

